



TITLE:

Studies on the binding kinetics and signaling biases of drugs targeting seven-transmembrane receptors( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

Shimizu, Yuji

---

CITATION:

Shimizu, Yuji. Studies on the binding kinetics and signaling biases of drugs targeting seven-transmembrane receptors. 京都大学, 2018, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2018-01-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.r13146>

RIGHT:

許諾条件により本文は2018-09-16に公開

( 続紙 1 )

京都大学	博士（農学）	氏名	清水 裕二
論文題目	Studies on the binding kinetics and signaling biases of drugs targeting seven-transmembrane receptors (7回膜貫通受容体を標的とする薬剤の結合速度論およびシグナリングバイアスに関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>ヒトで800種以上存在する7回膜貫通型受容体(7TMR、別名 G-protein-coupled receptor, GPCR)は、広範な細胞応答制御に関わっており、創薬ターゲットとして注目されてきた。しかし、その機能は複雑に制御されており、薬剤の作用メカニズムの理解は十分ではない。近年、受容体に対する薬剤の結合速度および受容体下流シグナルの理解がより良い薬剤の開発に重要と考えられるようになってきた。本研究では薬剤の結合速度論およびシグナリングバイアスに関する検討をおこなった。</p> <p>第一章では、薬剤耐性変異体に対するSmoothened受容体(SMO)アンタゴニストの作用メカニズムを解析した。基底細胞癌治療薬であるSMOアンタゴニストvismodegibは一過的に高い治療効果を示すが、治療と共に薬剤耐性変異(SMO-D473H)が生じることが分かっており、薬剤耐性を起こさない薬剤が望まれている。本研究では、SMOアンタゴニストTAK-441が野生型SMO (SMO-WT)のみならずSMO-D473Hに対しても活性を有するかどうか、またその作用メカニズムについて検討した。その結果、TAK-441はvismodegibと同じ結合ポケットに結合し、SMO-WTに対して同等の親和性を示すにも関わらず、vismodegibとは異なり、SMO-D473Hに対しても高い親和性を有することを見出した。結合速度解析の結果、TAK-441の受容体結合速度定数(<math>k_{on}</math>)はいずれの受容体に対しても同程度であったのに対し、解離速度定数(<math>k_{off}</math>)はSMO-WTよりもSMO-D473Hで有意に低下した。一方、vismodegibの<math>k_{off}</math>はSMO-WTとSMO-D473Hで同程度であったのに対し、<math>k_{on}</math>はSMO-WTよりもSMO-D473Hで大きく低下した。これらの結果は、結合速度の維持がSMO-D473Hに対する活性保持に貢献することを示唆している。本研究において、結合速度解析は薬剤作用の理解に有用であることを示した。</p> <p>第二章では、ハイスループットな結合速度解析方法を検討した。近年、より良い薬剤開発のために、薬剤の結合解離速度の理解が重要であるという認識が高まって来ているが、ハイスループットに結合速度パラメータを決定する方法は十分に整備されていない。そこで、本研究ではハイスループットな解析方法の開発を目的として、受容体と薬剤のプレインキュベーションが結合活性に与える影響を検討した。まず、非標識化合物のプレインキュベーションが標識プローブと受容体の結合に与える影響を記述するモデルを構築し、数式化したうえで、SMOをモデル受容体とした実際の実験</p>			

により本モデルの妥当性を証明した。さらに、本モデルを応用することでエンドポイント測定による薬剤の結合速度パラメータ決定法を確立した。本法は薬剤の結合速度パラメータをハイスループットに決定できることから、薬剤開発の初期において有用であることを示した。

第三章では、細胞の遊走、増殖等を制御する7TMRであるLPA1に対するGq-biased negative allosteric modulator (NAM)を探索した。LPA1は、4つのGタンパク質ファミリーのうちGq、Gi、G12/13を介して細胞内シグナルを活性化する。また、LPA1の活性化に伴い、アダプタータンパク質である $\beta$ -arrestinがリクルートされる。これらのシグナル分子はそれぞれ異なる細胞応答を引き起こすと考えられるが、その分子メカニズムの複雑さに加え、シグナル特異的に受容体機能を制御する薬剤が存在しないため、その詳細は明らかになっていない。本研究では、一部のシグナルのみを阻害する新規Gq-biased NAMをハイスループットスクリーニングにより複数同定し、その挙動をインピーダンスアッセイ(細胞の電気抵抗値解析)により評価した。各種シグナル阻害剤を用いた検討から、各時間におけるLPA1を介したインピーダンス変化はそれぞれ異なるシグナルに起因することを明らかにした。また、NAMによってインピーダンスに与える影響が異なったことから、シグナル制御は化合物によって異なる可能性を示した。本結果より、インピーダンスの経時評価は7TMRのシグナリングバイアスを評価するのに有用であることが示された。本研究で見出した化合物はLPA1を介した下流シグナルの重要性の理解およびより良い薬剤開発のためのツールとなることが期待される。

第四章では、2型糖尿病と関連のある7TMRであるGPR39の脱感作とシグナリングバイアスの関連について検討した。受容体脱感作は過剰なシグナル伝達を遮断するための重要な細胞恒常性維持機構であるが、薬剤耐性を引き起こす原因にもなるため、受容体脱感作を引き起こす化合物は薬剤として望ましくないことがある。本研究ではGPR39の脱感作メカニズムを解明するとともに、脱感作を起こさない化合物の探索をおこなった。Gs、Gq、G12/13および $\beta$ -arrestinシグナルを活性化するGPR39活性化薬GPR39-C3を用いて脱感作の検討をおこなった結果、GPR39-C3はGPR39の機能的脱感作を引き起こすこと、この脱感作はG12/13下流のRho-associated protein kinase (ROCK)シグナルによって誘導される受容体内在化によることが明らかとなった。また、G12/13/ROCK活性を持たないがGs活性化作用を有するバイアスドリグンドGSB-118をハイスループットスクリーニングにより同定し、本化合物はGPR39の脱感作を引き起こさないことを明らかにした。本研究により、脱感作を引き起こさない薬剤開発の可能性を示すとともに、ROCKを介した脱感作制御という7TMRの新たなフィードバック機構の存在を明らかにした。

(続紙 2 )

(論文審査の結果の要旨)

7 回膜貫通型受容体 (7TMR) は非常に広範な細胞応答制御に関わっており、薬剤標的として注目されている。実際、既存薬剤の 30-50% が 7TMR を標的としていると言われている。7TMR を介した薬剤の機能は古くから解析されてきたが、その詳細な分子機能メカニズムは不明な点も多く、アロステリック制御やシグナリングバイアスなど、近年新たな受容体機能制御メカニズムが次第に明らかになってきている。その中でも、7TMR に対する薬剤の結合解離速度および 7TMR 下流のシグナリングバイアスは薬剤の効果や副作用に大きく関わることから、これらの理解はより良い薬剤の開発および 7TMR 機能の解明において重要な課題となっている。本論文では薬剤の結合速度に関する検討をおこない、薬剤の作用メカニズムの理解における結合速度解析の有用性を示した。また、新規速度パラメータ解析法の開発をおこない、創薬初期における解析効率の向上に貢献した。さらに、7TMR 下流シグナルに関する検討を行い、細胞内インピーダンス変動がシグナリングバイアス評価に有用であることを示すとともに、ツール分子および薬剤候補となり得る新規 LPA1 biased ligand を同定した。また、GPR39 の脱感作に関する検討を行い、脱感作を引き起こさない新規 GPR39-biased ligand を同定した。本論文の評価すべき点は以下の通りである。

1. SMO アンタゴニスト TAK-441 が vismodegib 治療耐性変異に対して強力な阻害活性を有することを明らかにし、そのメカニズムとして受容体へ結合速度が重要であることを示した。
2. より良い薬剤の開発に重要な結合速度パラメータを迅速に決定する方法を開発した。
3. LPA1 を介した Gq シグナルを特異的に阻害する Gq-biased LPA1 NAM を初めて同定した。また、シグナリングバイアス評価として細胞インピーダンスを指標としたアッセイの有用性を示した。
4. G12/13/ROCK 経路を介した GPR39 の脱感作メカニズムを解明し、脱感作を引き起こさないバイアスドリガンドを同定することで、薬剤耐性に結びつかない薬剤開発の可能性を示した。

以上の通り、本論文は 7TMR の機能理解を深めるとともに、7TMR をターゲットにした薬剤開発の加速化および価値最大化に繋がる結果を示したものであり、細胞生化学、分子生物学、および基礎生理学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 29 年 11 月 9 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。